

Thrombose et thrombine

Citation for published version (APA):

Hemker, H. C., & Beguin, S. (1992). Thrombose et thrombine. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 50(3), 121-135.

Document status and date:

Published: 01/01/1992

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

REVUE

Thrombose et thrombine

H.C. HEMKER et S. BÉGUIN

Département de Biochimie et Institut de Recherches Cardiovasculaires,
Université du Limbourg,
PO Box 616, 6200 Maastricht, Pays-Bas.

Thrombosis and thrombin,

H.C. HEMKER and S. BÉGUIN, *Ann. Pharm. Fr.*, 1992, 50, 121-135.

SUMMARY. — *Thrombosis, either venous and arterial, is the most important cause of death in our society. Thrombin formation is a pivotal step in the pathogenesis of both forms of thrombosis. Drugs like heparin and vitamin K antagonists act because they inhibit thrombin formation. Better drugs than conventional heparin and oral anticoagulants are however urgently needed. They can be found on basis of a better understanding of thrombin formation.*

The mechanism of thrombin formation is explained. The mode in which conventional heparin and the newer, low molecular weight heparins inhibit this process is discussed. It is shown that, contrary to current belief, low molecular weight heparins inhibit primarily via their action on thrombin and that the inhibition of factor Xa is of less importance. Thrombin inhibition has a direct action but also acts indirectly via its influence on thrombin mediated feedback loops. It is argued that rather than anti-factor Xa activity or prolongation of some type of coagulation time, the time-concentration integral of thrombin (thrombin potential) in clotting plasma should be used as a yardstick for the efficiency of a thrombin inhibiting drug.

Thrombose et thrombine,

H.C. HEMKER et S. BÉGUIN, *Ann. Pharm. Fr.*, 1992, 50, 121-135.

RÉSUMÉ. — *La thrombose, qu'elle soit veineuse ou artérielle, est la cause de décès la plus fréquente dans notre société. La formation de la thrombine est l'élément central de la pathogénèse des deux formes de la thrombose. Les médicaments comme l'héparine et les anticoagulants oraux agissent en inhibant la formation de la thrombine. Il est important de trouver des médicaments plus efficaces que l'héparine traditionnelle ou que les anticoagulants oraux. Cette*

Texte reçu le 19 septembre 1991, faisant suite à une lecture à l'Académie Nationale de Pharmacie, le 7 octobre 1990, accepté le 6 mars 1992.

Tirés à part : H.C. HEMKER, à l'adresse ci-dessus.

recherche est basée sur une meilleure compréhension de la formation de la thrombine en milieu plasmatique.

Une revue de nos connaissances actuelles sur la génération de la thrombine est présentée. Le mode d'action de l'héparine conventionnelle et des héparines de bas poids moléculaire est développé. Il est démontré que, contrairement aux connaissances antérieurement acquises, l'action antithrombique de ces produits est due davantage à leur propriété anti-thrombine qu'à leur activité anti-facteur Xa. Il y a là une action directe sur la thrombine ainsi qu'indirecte par l'inhibition des phénomènes de rétroactivité.

Il est argumenté que pour juger de l'efficacité d'un anticoagulant, le potentiel de thrombine, c'est-à-dire l'intégrale (temps-concentration) de la courbe de génération de la thrombine est de loin préférable à la mesure de son activité anti-facteur Xa ou la prolongation du temps de céphaline.

En pathologie humaine, parmi les maladies contemporaines les plus fréquemment rencontrées, la thrombose occupe une place non négligeable. L'obturation des artères est à l'origine de l'infarctus et de l'attaque d'apoplexie. La thrombose veineuse survient chez les patients alités en situation postopératoire et peut entraîner une embolie pulmonaire fatale. Parmi les causes de mortalité en Europe et aux Etats-Unis, 50 % sont dus aux maladies thromboemboliques, 30 % au cancer tandis que les 20 % restants se répartissent entre les accidents de la circulation et diverses autres causes. La cause d'une thrombose est un caillot. Celui-ci n'est autre qu'un bouchon qui obstrue un vaisseau. L'étude de l'hémostase (système de la coagulation sanguine) et l'étude de la thrombose vont de pair. Dans les deux processus, la thrombine, l'enzyme responsable de la formation du caillot, joue le rôle principal.

En 1894, à Amsterdam, lors d'une séance de l'Académie Royale des Pays-Bas, PEKELHARING (1848-1922) rapporte qu'il a isolé du plasma sanguin une fraction protéique qui, en présence de facteur tissulaire provenant des vaisseaux sanguins, est capable de coaguler une autre protéine plasmatique et donc de former un caillot. Il en déduit très justement que la fraction isolée est la proenzyme (précurseur) de l'enzyme coagulante la thrombine, c'est-à-dire la prothrombine, et que l'autre fraction n'est autre que le fibrinogène.

Cette découverte de PEKELHARING est communément attribuée à l'Allemand Alexander SCHMIDT (1831-1894), alors que ce dernier n'avait fait qu'en postuler l'existence sans jamais, à notre connaissance, l'avoir démontrée expérimentalement. La thrombine provient de la coopération d'une quinzaine de protéines plasmatiques (facteurs de coagulation). La survenue de la thrombose peut être évitée par des thérapeutiques faisant appel à des substances pharmaceutiques, inhibitrices de la thrombine, actuellement divisées en deux grands groupes : les anticoagulants oraux et les héparines. Les anticoagulants oraux tels que la Coumadine, la Pindione, le Tromexane, le Sintrom, sont

des antagonistes de la vitamine K. Ils bloquent partiellement, dans le foie, la dernière étape de la formation des facteurs de coagulation, qui apparaissent alors dans le plasma sous des formes anormales : PIVKA (protein induced by vitamin K absence). Cette transformation incomplète entraîne une diminution et un ralentissement de la production de thrombine [9, 10, 18, 26]. Les héparines agissent différemment, elles catalysent l'activité inhibitrice d'une antiprotéase plasmatique : l'antithrombine III, essentiellement à l'égard de la thrombine. Le fait que les anticoagulants oraux et les héparines, d'un mécanisme d'action fondamentalement différent, produisent le même effet final, en diminuant de moitié le risque de la thrombose, apporte la preuve du rôle primordial de la thrombine.

Afin d'être plus complet, nous mentionnerons la part modeste (20 %) de l'aspirine dans la prévention de la thrombose, vraisemblablement due à son effet sur les plaquettes sanguines (thrombocytes), qui peut très bien d'ailleurs être un effet sur le mécanisme procoagulant des plaquettes [17].

En raison du rôle central tenu par la thrombine, son inhibition par une thérapeutique antithrombotique peut avoir pour conséquence majeure la survenue de saignements. Tout l'art d'une thérapeutique antithrombotique réside dans l'équilibre à maintenir entre les frontières du saignement et de la thrombose.

Actuellement, les moyens thérapeutiques disponibles ne sont pas idéaux. Les héparines qui, par voie sous-cutanée, doivent être injectées au patient toutes les 4 h ne se prêtent pas à un traitement au long cours.

La prescription des antivitamines K données par voie orale exige, quant à la posologie, un dosage précis et rigoureux adapté à chaque patient et qui devra être contrôlé dans des laboratoires spécialisés. Aux Pays-Bas, la surveillance de tels traitements ne pose aucun problème en raison de l'organisation d'un vaste réseau de services de thrombose. Grâce aux travaux de LOELIGER [19] et de ses collaborateurs, à Leiden de 1960 à 1985, l'incidence de récurrence d'infarctus chez les patients traités par les antivitamines K a diminué de moitié. Ce qui prouve l'efficacité d'un tel traitement, alors que le fait n'est pas encore établi aux Etats-Unis et en Allemagne en raison des problèmes pratiques posés par une posologie délicate et par la surveillance du traitement. L'idéal recherché par l'industrie pharmaceutique serait de donner par voie orale une dose unique, standard, qui protégerait de la thrombose, sans entraîner un risque hémorragique. C'est la raison pour laquelle la recherche pharmaceutique s'oriente vers la production d'héparines plus efficaces. Avant de rentrer dans le vif du sujet, il est impératif de rappeler les bases du mécanisme de la coagulation du sang.

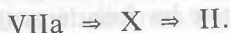
MÉCANISME DE LA FORMATION DE LA THROMBINE

La formation de la thrombine est une suite de réactions enzymatiques proenzyme/enzyme à la surface de couches phospholipidiques. Ces réactions peuvent être déclenchées par des lésions tissulaires ou par l'activation des thrombocytes. Le processus de la coagulation résulte d'un système complexe de réactions d'activation positives et négatives. Une fois formée, la thrombine est inactivée par les antithrombines. Examinons brièvement chacune des principales séquences.

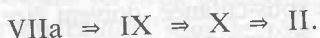
Cascades proenzyme-enzyme

La base de la coagulation sanguine est l'activation d'une proenzyme par une autre enzyme, comme par exemple l'action de l'entérokinase sur le trypsinogène qui produit la trypsine gastrique. La plupart des schémas théoriques de l'hémostase, même les plus anciens [7, 20], sont basés sur ce principe.

Si, comme pour la réaction entérokinase \Rightarrow trypsine, la flèche ouverte représente l'activation (fig. 1), le schéma de l'hémostase s'articulera sur l'activation de la prothrombine (facteur II) par le facteur X, lui-même activé par le facteur VII, ainsi aurons-nous :



Le facteur VII active non seulement le facteur X, mais aussi le facteur IX qui à son tour peut activer le facteur X.



Cette activation du facteur IX par le facteur VII, bien que faible, constitue une boucle de renforcement pour l'activation du facteur X. Nous l'avons baptisée boucle Josso, du nom du français François JOSSO (1927-1981) qui l'a mise en évidence [15, 16].

Biocatalyse hétérogène ; phospholipides et co-facteurs

Le second principe général du mécanisme biochimique de l'hémostase est la biocatalyse hétérogène. C'est-à-dire que, les réactions d'activation se développant en interphase (lipides-eau), l'activation de la prothrombine par le facteur Xa peut à la rigueur se faire en solution libre. Cependant, il faudra alors 60 fois la concentration plasmatique de la prothrombine (2 μM) pour atteindre la moitié de la vitesse maximale de formation de thrombine. A cette vitesse, une seule molécule de thrombine sera produite en 1 mn 1/2 par une molécule de facteur Xa. Ce qui correspondrait, en milieu plasmatique, à l'obtention d'une concentration de thrombine inférieure à 10 picomoles. La quantité de thrombine libre formée en milieu plasmatique lors de la coagulation

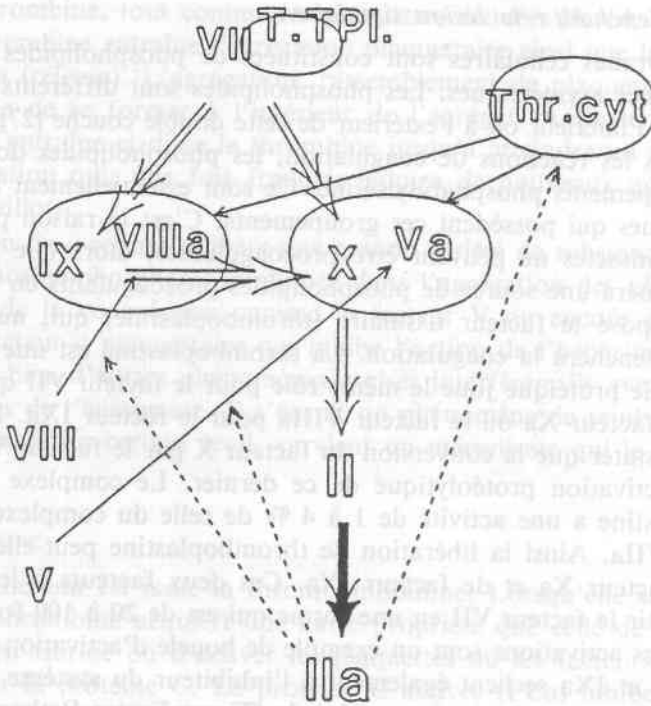


FIG. 1. — Un schéma de la coagulation.

⇒ activation enzymatique ; ----> Boucle d'activation positive ; → conversion chimique ;
 plage ovale : surface phospholipidique ; T. TPI : thromboplastine tissulaire ; Thr. cyt : thrombocytes
 (plaquettes sanguines).

A reaction scheme of blood coagulation.

*The open arrows indicate enzymatic activations ; positive feedback reactions are indicated with dotted lines ; drawn arrows are chemical conversions ; the ovals represent phospholipid surfaces ;
 T. TPI : tissue thromboplastin ; Thr. cyt : blood platelet.*

est de l'ordre de 200 à 400 mM. La conversion normale de la prothrombine par le facteur X activé (Xa) n'est possible que par l'assemblage enzymatique du facteur Xa et du facteur Va fixés sur une surface phospholipidique [12, 21]. Les phospholipides abaissent la constante de Michaelis (K_m) de la prothrombine de 120 μ M à 30 nM [24] et, ainsi, favorisent la saturation de l'enzyme par le substrat. Le co-facteur plasmatique (F.Va) accélère la vitesse de conversion d'environ 1 000 fois [24]. L'activation du facteur X est semblable à celle de la prothrombine et requiert également un complexe enzymatique [11] dont le facteur VIII activé est le cofacteur principal. Les effets cinétiques sont similaires à ceux du complexe prothrombinase [8]. Les phospholipides sont représentés par une plage ovale dans la figure 1.

L'agent déclenchant : la lésion tissulaire

Les membranes cellulaires sont constituées de phospholipides disposés en double couches asymétriques. Les phospholipides sont différents selon qu'ils sont situés à l'intérieur ou à l'extérieur de cette double couche [27]. Pour jouer un rôle dans les réactions de coagulation, les phospholipides doivent contenir des groupements phosphatidylsérine. Ce sont essentiellement les phospholipides internes qui possèdent ces groupements. C'est la raison pour laquelle les cellules intactes ne peuvent être procoagulantes, alors que toute cellule lésée constituera une source de phospholipides procoagulants en même temps que sera exposé le facteur tissulaire (thromboplastine) qui, au contact du plasma, déclenchera la coagulation. La thromboplastine est une lipoprotéine dont la partie protéique joue le même rôle pour le facteur VII que le facteur Va pour le facteur Xa ou le facteur VIIa pour le facteur IXa. Il est intéressant de constater que la conversion du facteur X par le facteur VII ne nécessite pas l'activation protéolytique de ce dernier. Le complexe facteur VII-thromboplastine a une activité de 1 à 4 % de celle du complexe formé avec le facteur VIIa. Ainsi la libération de thromboplastine peut-elle générer des traces de facteur Xa et de facteur IXa. Ces deux facteurs à leur tour peuvent convertir le facteur VII en une forme qui est de 20 à 100 fois plus active (F.VIIa). Ces activations sont un exemple de boucle d'activation positive. Les facteurs Xa et IXa se lient également à l'inhibiteur du système extrinsèque : TFPI selon la nomenclature internationale (Tissue Factor Pathway Inhibitor). Le TFPI combiné au facteur Xa forme un inhibiteur puissant du complexe facteur VIIa-thromboplastine. Ceci a pour conséquence, au cours du temps, de limiter très rapidement l'activation des facteurs X et IX. Malgré cette inhibition, il reste suffisamment de facteur IXa pour activer le facteur X disponible. Ceci pourrait expliquer l'utilité de la boucle Josso.

Le rôle des plaquettes sanguines

Sans qu'aucune lésion ne soit nécessaire, les plaquettes intactes peuvent agir dans l'hémostase. Dès qu'elles restent un certain temps en contact avec des traces infimes de thrombine et, qu'en même temps, elles sont activées par le collagène, les plaquettes induisent la réaction de « flip-flop » par translocation de leur membrane [4, 5, 25]. Les phosphatidylsérines se répartissent alors des deux côtés de la membrane cellulaire, sans qu'il y ait altération de cette dernière.

Boucle d'activation positive

Si la lésion tissulaire déclenche la coagulation, elle ne peut cependant pas l'achever sans la participation des accélérateurs : les facteurs Va et VIIa qui eux-mêmes résultent de l'activation des facteurs V et VIII par les premières

traces de thrombine, tout comme les plaquettes activées [3, 14, 23]. L'apparition de thrombine entraîne l'agrégation plaquettaire ainsi que le phénomène de libération (release). L'agrégation, rassemblement de plaquettes, permet à la thrombine de se former à l'intérieur de l'agrégat. A l'extérieur, le flux plasmatique entraîne et dilue la thrombine jusqu'à atteindre un seuil critique de concentration qui, une fois franchi, induira de nouveaux agrégats et de nouveaux caillots.

La réaction de « release » libère une grande variété de substances telles que l'ADP (adénosine-phosphate) impliquée dans l'agrégation des plaquettes, ou de facteurs de la coagulation comme le facteur V ou encore de substance comme le facteur 4 plaquettaire qui inhibe l'action de l'héparine en se liant à elle. Ainsi bien d'autres phénomènes croisés interfèrent-ils avec les processus chimiques de l'hémostase. Il s'ensuit un phénomène de seuils. Dès qu'un stimulus dépasse un certain seuil, survient un mécanisme qui le renforce ou l'étouffe.

Boucle négative

De l'endothélium est issue la thrombomoduline. Lorsqu'elle se lie à cette protéine, la thrombine acquiert une autre propriété que celle de convertir le fibrinogène en fibrine ou d'activer les plaquettes ou les facteurs V et VIII, celle d'activer la protéine C. La protéine C activée (PCa) inhibe les formes activées des facteurs V et VIII, ceci en association avec son cofacteur la protéine S. Dans ces circonstances, tant que restera intact l'endothélium, la thrombine limitera sa propre formation jusqu'à ce que survienne une lésion vasculaire qui constituera alors une surface procoagulante.

Inactivation de la thrombine

Dans le plasma, existe une série d'antiprotéases qui inhibent les enzymes activées. L'antithrombine III (AT III) est la plus importante. Elle inhibe un grand nombre de sérines protéases mais son affinité pour la thrombine prédomine. Cette antiprotéase est primordiale parce que les héparines potentialisent au moins cent fois son activité (voir plus loin). L'héparine cofacteur II (HC II) est un autre inhibiteur de la thrombine ; inactif en l'absence d'une concentration usuelle d'héparine, il peut cependant être activé par différents polyélectrolytes négatifs tels que le sulfate de dermatane, l'acide lactobionique. Enfin, l' α_2 -macroglobuline est un remarquable inhibiteur qui agit seul et différemment des autres antiprotéases : en ce sens qu'elle ne se fixe pas au site actif de l'enzyme, mais en quelque sorte « l'avale » dans sa structure particulière. Ce complexe enzyme-inhibiteur qui, par encombrement stérique, empêche l'activité de la thrombine à l'égard de son substrat physiologique

le fibrinogène, reste actif vis-à-vis des petites molécules telles que les substrats chromogéniques utilisés pour mesurer l'activité amidolytique de la thrombine.

Bien qu'intéressante, cette propriété complique l'interprétation de nos résultats expérimentaux.

ENZYMOLOGIE ET PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Un grand nombre des mécanismes d'action mentionnés précédemment a pu être étudié en système purifié, à l'aide des protéines de la coagulation, préalablement isolées du plasma sanguin. Cependant ces études seraient incomplètes sans l'exploration de la « physiologie moléculaire » au sein du plasma, voire même du sang, ceux-ci pouvant être alors considérés comme « organes isolés ». Ces données, plus proches de la physiologie s'avèrent parfois bien différentes de celles attendues par les biochimistes. Pour cette raison, la plupart de nos résultats concernant les héparines furent obtenus en milieu plasmatique ou sanguin.

RAPPORT ENTRE HÉPARINES ET FACTEUR Xa : HYPOTHÈSE CLASSIQUE

L'héparine provient de la muqueuse intestinale de Porc ou du poumon de Bœuf. L'héparine est une longue chaîne polysaccharidique constituée d'une alternance d'acides iduroniques et glycuroniques et de glucosamides, possédant à différentes séquences de la chaîne des groupements acétylés ou sulfatés. Son poids moléculaire varie de 5 000 à 30 000 daltons, la moyenne se situant entre 12 et 15 000 daltons (35 à 45 sucres). Environ un tiers de toutes les molécules d'héparine peut se lier à l'antithrombine III. Cela a pour effet de catalyser l'action inhibitrice de l'AT III à l'égard de la thrombine et des formes activées de certaines protéines de la coagulation, diminuant ainsi la concentration de thrombine dans le sang coagulant. La liaison AT III-héparine nécessite la présence, dans la molécule d'héparine, d'une séquence pentasaccharidique spécifique (fig. 2).

L'héparine, est un antithrombotique efficace, mais elle doit être injectée 3 fois par jour. Son administration peut provoquer des saignements et induire des thrombopénies. De plus comme nous l'avons déjà mentionné, son administration au long cours n'est pas souhaitable.

Cette dernière décennie, sont apparues les héparines de faible masse moléculaire (HBPM). Obtenues par hydrolyse de l'héparine, leur poids moléculaire varie entre 2 000 et 7 000 daltons. Bien qu'agissant comme l'héparine, ces héparines fractionnées produisent moins de saignement et induisent moins d'effets secondaires. Elles ont également l'avantage de n'être injectées qu'une fois par jour. On émit l'hypothèse, voici quelques années, qu'en abaissant

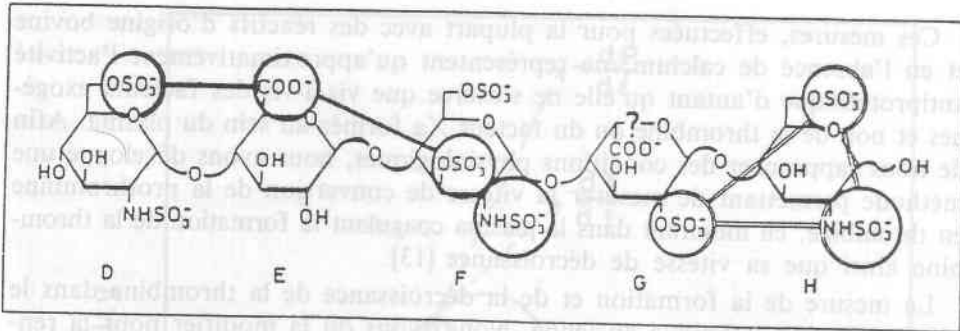


FIG. 2. — Séquence pentasaccharidique de fixation à l'AT III de l'héparine (selon [22]). Dans les cercles D, E et F sont représentés les groupements nécessaires pour la liaison à l'AT III, qui sera renforcée par les groupements figurants dans les cercles G et H.

The AT III binding pentasaccharide from heparin.

The groups indicated by circles in D, E and F first bind weakly to AT III, after which the binding is reinforced by the groups circled in G and H (from [22]).

le poids moléculaire, l'activité antithrombine serait diminuée alors qu'augmenterait l'activité anti-facteur Xa. C'est ainsi que naquit l'hypothèse suivante : l'activité anti-facteur Xa déterminerait le pouvoir antithrombotique d'une héparine tandis que les saignements seraient dus à son activité anti-thrombine.

L'objectif premier d'une industrie pharmaceutique étant de développer des antithrombotiques à faible risque hémorragique, cette hypothèse fut retenue comme une valeur sûre.

Le pharmacien français Jean CHOAY [6] en tira la conséquence logique en synthétisant en 1983, avec son équipe, en 74 étapes, le plus petit saccharide capable de se lier à l'AT III. Ce pentasaccharide, en se liant à l'AT III, catalyse uniquement son action sur le facteur Xa et n'a aucun effet sur son pouvoir antithrombotique. La question se posa alors de savoir si cette propriété particulière lui confère un meilleur pouvoir antithrombotique. Avant de tenter de répondre à cette question, examinons les méthodes d'investigation des héparines.

MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTITHROMBINE ET ANTI-FACTEUR Xa DES HÉPARINES

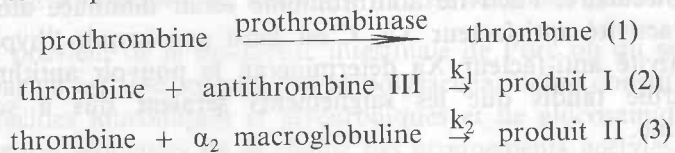
Ces activités sont généralement déterminées en mesurant la décroissance des facteurs purifiés (thrombine, facteur Xa) ajoutés à un échantillon de plasma en présence de l'héparine à étudier, selon le principe suivant :

thrombine (facteur Xa) + AT III $\xrightarrow{\text{héparine}}$ produit inactif.

Ces mesures, effectuées pour la plupart avec des réactifs d'origine bovine et en l'absence de calcium, ne représentent qu'approximativement l'activité antiprotéasique d'autant qu'elle ne s'exerce que vis-à-vis des facteurs exogènes et non de la thrombine ou du facteur Xa formés au sein du plasma. Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques, nous avons développé une méthode permettant de mesurer la vitesse de conversion de la prothrombine en thrombine, en mesurant dans le plasma coagulant la formation de la thrombine ainsi que sa vitesse de décroissance [13].

La mesure de la formation et de la décroissance de la thrombine dans le plasma est une technique ancienne. Nous avons dû la modifier pour la rendre plus exacte et plus représentative du phénomène. Pour ce faire, nous avons développé un photomètre à 2 longueurs d'ondes, d'une grande précision, pour mesurer l'activité amidolytique de la thrombine, ainsi qu'un système informatisé de pipetage et d'enregistrement au cours du temps des échantillons de thrombine formée au sein du plasma coagulant.

La concentration de thrombine est la résultante d'une suite de réactions en chaînes telles que :



Les réactions 2 et 3 sont des réactions de pseudo premier ordre : les inhibiteurs étant en excès, la vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration de thrombine.

La formation de la thrombine en plasma peut être comparée au remplissage continu d'une baignoire. Plus haut monte le niveau plus vite il s'abaisse. Ainsi en est-il de même pour le niveau de la thrombine dans le plasma coagulant : il s'abaissera d'autant plus rapidement que la concentration de thrombine augmentera. L'héparine accroît la constante de la réaction (1) en ouvrant, pour ainsi dire davantage, l'orifice d'écoulement de la baignoire. L'interprétation du mode d'action de l'héparine à l'égard du facteur Xa, repose sur l'hypothèse que l'héparine, non seulement élargit l'orifice d'écoulement mais diminue également l'afflux. Voulant vérifier cette hypothèse, nous avons calculé la vitesse de conversion de la prothrombine et thrombine $-\frac{dP}{dt}$ (P = concentration

de la prothrombine) à partir de la courbe expérimentale de génération de thrombine dont la figure 3 donne un exemple. Les valeurs expérimentales représentent la somme de la vitesse de formation de la thrombine due à la conversion de la prothrombine $-\frac{dP}{dt}$ et la vitesse (v_{dec}) de disparition de la

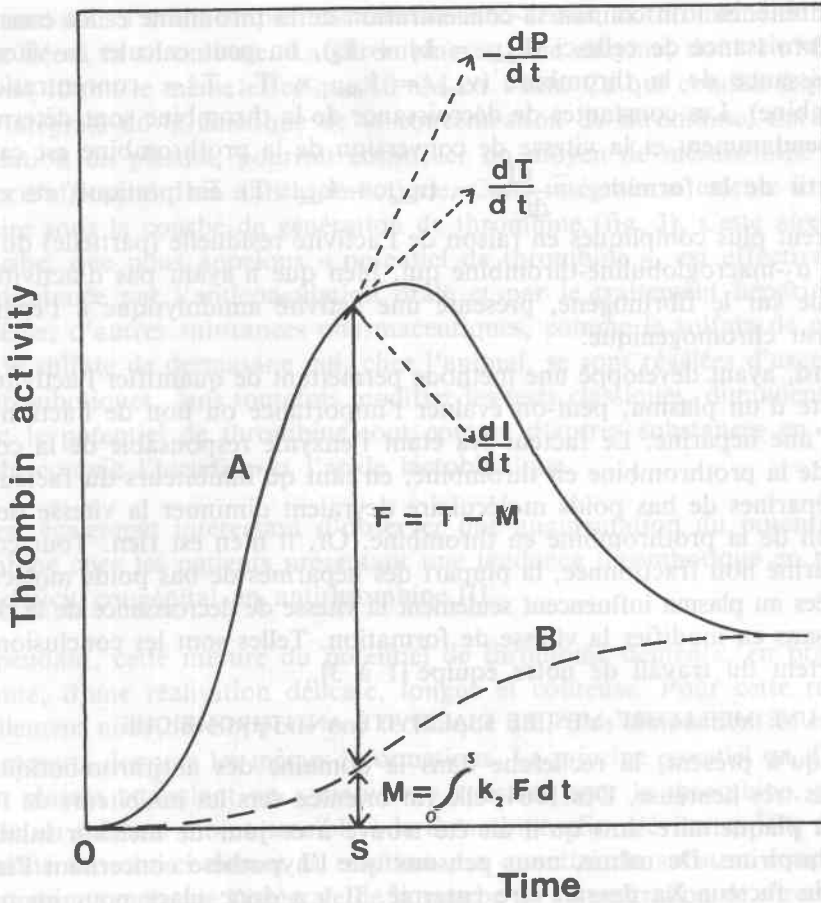


FIG. 3. — Analyse de la courbe de génération de thrombine.

Courbe A : courbe expérimentale de l'activité amidolytique de la thrombine (T).

B représente l'activité amidolytique résiduelle du complexe α_2 M-thrombine (M). La vitesse

$-\frac{dP}{dt}$ de la conversion de la prothrombine en thrombine est donnée par la somme de la vitesse

de décroissance $\frac{dI}{dt}$ de la thrombine et de sa vitesse expérimentale de formation $\frac{dT}{dt}$.

Analysis of the thrombin generation curve.

Curve A is the amidolytic activity that is experimentally determined (T).

B is the part contributed by the α_2 M-thrombin complex (M). The decay velocity of thrombin (dI/dt) plus the experimental velocity (dT/dt) gives the conversion velocity of prothrombin ($-dP/dt$).

thrombine. Si l'on connaît la concentration de la thrombine et les constantes de décroissance de celle-ci ($k_{\text{dec}} = k_1 + k_2$), on peut calculer la vitesse de décroissance de la thrombine ($v_{\text{dec}} = k_{\text{dec}} \times T$; T = concentration de thrombine). Les constantes de décroissance de la thrombine sont déterminées indépendamment et la vitesse de conversion de la prothrombine est calculée à partir de la formule $-\frac{dP}{dt} = (v_{\text{exp}} + k_{\text{dec}} \cdot T)$. En pratique, ces calculs s'avèrent plus compliqués en raison de l'activité résiduelle (partielle) du complexe α_2 -macroglobuline-thrombine qui, bien que n'ayant pas d'activité biologique sur le fibrinogène, présente une activité amidolytique à l'égard du substrat chromogénique.

Ainsi, ayant développé une méthode permettant de quantifier l'activité coagulante d'un plasma, peut-on évaluer l'importance ou non de l'action anti-Xa d'une héparine. Le facteur Xa étant l'enzyme responsable de la conversion de la prothrombine en thrombine, en tant qu'inhibiteurs du facteur Xa, les héparines de bas poids moléculaire devraient diminuer la vitesse de conversion de la prothrombine en thrombine. Or, il n'en est rien. Tout comme l'héparine non fractionnée, la plupart des héparines de bas poids moléculaire ajoutées au plasma influencent seulement la vitesse de décroissance de la thrombine sans en modifier la vitesse de formation. Telles sont les conclusions qui ressortent du travail de notre équipe [1 à 3].

VERS UNE MEILLEURE MESURE D'ACTIVITÉ ANTITHROMBIQUE

Jusqu'à présent, la recherche dans le domaine des antithrombotiques ne fut pas très heureuse. Dès 1964, elle fut orientée vers les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire sans qu'il ait été trouvé à ce jour de meilleur inhibiteur que l'aspirine. De même, nous pensons que l'hypothèse concernant l'inhibition du facteur Xa devrait être enterrée. Il y a donc place pour un nouvel objectif.

Quel serait *in vitro* le modèle idéal qui reflètera le mieux l'activité antithrombotique d'un produit ? Tout d'abord, il devra s'avérer influencé par tout produit susceptible d'agir en tant qu'antithrombotique de quelque nature qu'il soit. En second lieu, que, par ce test, soient retrouvées les mêmes variations dans le sang des patients soumis au traitement antithrombotique que dans le sang auquel aura été ajouté ce même antithrombotique. En fait, que ce test reflète *in vitro* la situation *in vivo*. Et, de préférence, que les différentes formes de traitement anticoagulant (antivitamines K, héparines) entraînent quantitativement les mêmes modifications du test. Troisièmement, que ce test puisse dépister les patients à haut risque de thrombose. Enfin que, pour l'exigence de la surveillance du traitement, le test puisse être facilement reproduit en pratique courante dans les laboratoires.

Comme nous l'avons amplement mentionné ci-dessus, la thrombine est étroitement liée à la thrombose. La thrombine est une enzyme, dont 1 nM produira en 10 mn le même effet que 10 nM en 1 mn. Ce qui conduit à penser que l'intégrale de la cinétique de la concentration de thrombine, durant la coagulation du plasma, pourrait constituer un moyen de mesure utile pour évaluer l'efficacité d'un antithrombotique. Cette intégrale se calcule à partir de l'aire sous la courbe de génération de thrombine (fig. 3). Cette aire sous la courbe, que nous appelons « potentiel de thrombine », est effectivement bien diminuée par l'anticoagulation orale et par le traitement héparinique. De même, d'autres substances pharmaceutiques, comme le sulfate de pentosane, le sulfate de dermatane qui, chez l'animal, se sont révélées d'excellents antithrombotiques, sans toutefois modifier les tests classiques, diminuent également le potentiel de thrombine tout comme d'autres substances en cours d'étude comme l'hirudine et l'acide lactobionique.

Il est également intéressant d'observer une augmentation du potentiel de thrombine chez les patients présentant une tendance thrombotique en raison d'un déficit congénital en antithrombine III.

Cependant, cette mesure du potentiel de thrombine demeure, en pratique courante, d'une réalisation délicate, longue et coûteuse. Pour cette raison, actuellement nous développons une technique qui, plus simplement et en une seule mesure, donnera les mêmes informations. Le principe essentiel est d'ajouter au plasma coagulant un « mauvais » substrat pour la thrombine, ce qui signifie un substrat moins sensible à la thrombine afin d'éviter qu'elle épuise la totalité de celui-ci durant la réaction. La quantité du substrat coupé par la thrombine représente l'intégrale de la courbe de concentration de thrombine.

Cette méthode fait apparaître que les doses efficaces, soit d'héparine non fractionnée, soit d'héparine de bas poids moléculaire, produisent le même effet sur la formation de la thrombine en plasma. L'efficacité d'une héparine de bas poids moléculaire vraisemblablement dépend en priorité de certaines qualités : sa demi-vie plus grande que celle de l'héparine et son passage, intégral, dans la circulation sanguine dans un laps de temps d'environ 2 h après son injection sous-cutanée, tandis que pour l'héparine standard seulement un tiers du matériel injecté est retrouvé.

Nous espérons que cette méthode, qui est nôtre, permettra de détecter de nouveaux anti-thrombotiques et qu'elle pourra constituer en clinique un test standard de routine pour la surveillance des traitements antithrombotiques.

CONCLUSION

L'étude plus poussée de différentes héparines a montré que leur efficacité est la résultante de deux tendances. Au-dessous d'un poids moléculaire avoisinant le seuil de 5 400 daltons, les héparines perdent leur activité à l'égard de la thrombine, donc leur principale activité antithrombotique. Plus s'abaisse le poids moléculaire, meilleures sont la demi-vie et la biodisponibilité des héparines. En pratique, jusqu'à un poids moléculaire de 7 200, la pharmacocinétique demeure convenable, ne nécessitant qu'une seule injection par jour pour le recouvrement total du matériel injecté par voie sous-cutanée. Les meilleurs héparines semblent donc se situer dans un ordre de poids moléculaires compris entre 5 400 et 7 200 daltons.

Il est aussi possible d'administrer les héparines de bas poids moléculaire autrement que par injection. Par voie orale ou par inhalation, le matériel peut se retrouver en quantité raisonnable dans la circulation sanguine. Cependant, la difficulté d'une telle administration réside dans le fait que son dosage est imprécis et par là-même peut entraîner des saignements.

Dans ce contexte, il est intéressant de songer à des héparinoïdes tels que le sulfate de dermatane, l'acide lactobionique qui agissent via le deuxième cofacteur de l'héparine. La concentration plasmatique de cette protéase est d'une μM , ce qui est peu par rapport à celle de l'antithrombine III ($\sim 2 \mu\text{M}$) et notamment moins que celle de la prothrombine ($\sim 2 \mu\text{M}$) donc bien plus faible que le potentiel de thrombine. Ce qui limite de façon naturelle l'activité du sulfate de dermatane et évite le risque de surdosage.

RÉFÉRENCES

- [1] BÉGUIN S., LINDHOUT T. & HEMKER H.C., *Thromb. Haemost.*, 1988, 60, 457-462.
- [2] BÉGUIN S., MARDIGUIAN J., LINDHOUT T. & HEMKER H.C., *Thromb. Haemost.*, 1989, 61, 30-34.
- [3] BÉGUIN S., LINDHOUT T., HEMKER H.C., *Thromb. Haemost.*, 1989, 61, 25-29.
- [4] BEVERS E.M., COMFURIUS P., RIJN-VAN J.L.M.L., HEMKER H.C. & ZWAAL R.F.A., *Eur. J. Biochem.*, 1982, 122, 429-436.
- [5] BEVERS E.M., COMFURIUS P., HEMKER H.C. & ZWAAL R.F.A., *Thromb. Res.*, 1984, 33, 553-554.
- [6] CHOAY J., PETITOU M., LORMEAU J.C., SINAY P., CASU B., GATTI G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, 116, 492-499.
- [7] DAVIES E. & RATTNOFF O., *Science*, 1964, 145, 1310-1312.
- [8] DIEIJEN-VAN G., TANS G., ROSING J. & HEMKER H.C., *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 3433-3442.
- [9] HEMKER H.C., VELTKAMP J.J., HENSEN A. & LOELIGER E.A., *Nature*, 1963, 200, 589-590.
- [10] HEMKER H.C., HEMKER P.W. & LOELIGER E.A., *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1965, 13, 155-175.

- [11] HEMKER H.C. & KAHN M.J.P., *Nature*, 1967, 215, 1201.
- [12] HEMKER H.C., ESNOUF M.P., HEMKER P.W., SWART A.C.W. & MacFARLANE R.G., *Nature*, 1967, 215, 248-251.
- [13] HEMKER H.C., WILLEMS C.M. & BÉGUIN S., *Thromb. Haemostas.*, 1986, 56, 9-17.
- [14] HURLET-BIRK JENSEN A., BÉGUIN S. & JOSSO F., *Pathol. Biol.*, 1976, 24, 6-10.
- [15] JOSSO F. & PROU-WARTELLE O., *Thromb. Diath. Hemorrh.*, 1965, 171, Suppl., 35-44.
- [16] JOSSO F. & BÉGUIN S., *The possible role of factor VII in the intrinsic system*, in : *Human blood coagulation. Biochemistry, Clinical Investigation and Therapy*. HEMKER H.C., LOELIGER E.A. & VELTKAMP J.J. Edit., 1969, 77-82.
- [17] KESSELS H., *Communication personnelle*, 1991.
- [18] LINDHOUT M.J., KOP-KLAASSEN B.H.M., REEKERS P.P.M. & HEMKER H.C., *J. Mol. Med.*, 1976, 1, 223-235.
- [19] LOELIGER E.A., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1984, 25, 137-139 ; *Processes Thromb. Haemost.*, 1986, 56, 9-17.
- [20] MacFARLANE R.G., *Nature*, 1964, 202, 498.
- [21] PAPAHADJOPOULOS D. & HANAHAN D.J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 90, 436-439.
- [22] PETITOU M., LORMEAU J.C. & CHOAY J., *Eur. J. Biochem.*, 1988, 176, 637-640.
- [23] PIETERS J., LINDHOUT T. & HEMKER H.C., *Blood*, 1989, 74, 1021-1024.
- [24] ROSING J., TANS G., GOVERS-RIEMSLAG J.W.P., ZWAAL R.F.A. & HEMKER H.C., *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 274-283.
- [25] ROSING J., RIJN-VAN J.M.L.M., BEVERS E.M., DIEIJEN-VAN G., COMFURIUS P. & ZWAAL R.F.A., *Blood*, 1985, 65, 319-332.
- [26] VERMEER C., SOUTE B.A.M., GOVERS-RIEMSLAG J. & HEMKER H.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 444, 926-930.
- [27] ZWAAL R.F.A., COMFURIUS P. & DEENEN-VAN L.L.M., *Nature*, 1977, 268, 358-360.